乳酸脱氢酶（LDH）活性检测试剂盒说明书

规格：96 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1.使用前请通读一遍说明书再开始实验。

2.正式检测前选取 2~3 个预期差异较大的样本进行预检测，如果ΔA>1.15，将上清液进行稀释后再检测，直至ΔA<1.15。

3.本试剂盒仅用于科研。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
提取液	60 mL×1	4℃	
试剂一	6 mL×1	4℃	
试剂二	粉剂×2	4℃	
试剂三	6 mL×1	4℃避光	
试剂四	20 mL×1	4℃	
试剂五	100 μL×1	4℃避光	

三、仪器和用品

酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、96 孔板、可调式移液器、可降温离心机、匀浆器/细胞超声破碎仪、超纯水/蒸馏水。

四、样品制备

1. 细菌、细胞样品的制备

细菌或培养细胞：收集细菌或细胞到离心管中，离心后弃上清。按照细菌或细胞数量（10^4个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎（功率 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次）；10000 g，4℃离心 10 min 后，置于冰上，上清为待测样本。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆，10000 g，4℃离心 10 min 后，置于冰上，上清为待测样本。

2. 血清、血浆等液体样品：直接测定。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 450 nm 处。

2. 试剂二用时加入 10 μL 试剂五和 1.3 mL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

3. 在 96 孔板中依次加入（加入下列试剂时确保准确，降低误差）：

试剂名称	测定管	对照管
待测样本（μL）	10	10
试剂一（μL）	50	50
试剂二（μL）	10	-
超纯水（μL）	-	10
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）反应 15 min		
试剂三（μL）	50	50
充分混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）反应 15 min		
试剂四（μL）	150	150
充分混匀，室温静置 3min，450 nm 下测定吸光度，计算ΔA=A 测定管-A 对照管。 注意：每个测定管需要设一个对照管。		

六、计算：

1. 标准方程

标准条件下测定的回归方程为 y =0.3888x+0.0056，R^2=0.9995；x 为标准溶液浓度，μmol/mL；y 为ΔA。

2.按照血清（浆）体积计算

单位定义：每分钟每 mL 血清（浆）样本催化产生 1 nmol 丙酮酸的量为一个酶活性单位。

乳酸脱氢酶（LDH）活性（U/mL）=（ΔA-0.0056）÷0.3888÷T×10^3×F=171.468×（ΔA-0.0056）×F

3.按照蛋白浓度计算（需另外测蛋白浓度）

单位定义：每分钟每mg组织蛋白催化产生1 nmol丙酮酸的量为一个酶活性单位。

乳酸脱氢酶（LDH）活性（U/mg prot）=[（ΔA-0.0056）÷0.3888×V1]÷（V1×Cpr）÷T×10^3×F=171.468×（ΔA-0.0056）÷Cpr×F

4.按照样本质量计算

单位定义：每分钟每 g 样本催化产生 1nmol 丙酮酸的量为一个酶活性单位。

乳酸脱氢酶（LDH）活性（U/g 鲜重）=[（ΔA-0.0056）÷0.3888×V1]÷（W×V1÷V2）÷T×10^3×F=171.468×（ΔA-0.0056）÷W×F

5.按照细菌或细胞密度计算

单位定义：每分钟每 10^4细菌或细胞催化产生 1 nmol 丙酮酸的量为一个酶活性单位。

乳酸脱氢酶（LDH）活性（U/10^4 cell）=[（ΔA-0 .0056）÷0.3888×V1]÷（N×V1÷V2）÷T×10^3×F=171.468×（ΔA-0 .0056）÷N×F

V1：加入样本体积，0.01 mL；V2：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，15 min；F：样本稀释倍数；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样品质量，g；N：细胞或细菌总数（万个）；10^3：1 μmol/mL=10^3nmol/mL。

七、产品简介

乳酸脱氢酶（LDH）广泛存在于各类生物中，是糖酵解途径的末端酶，催化丙酮酸与 L-乳酸之间的可逆反应，伴随着 NAD+/NADH 之间互变。